

**דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר 203-0760-09**

**חקר ומניפולציה מבנית/תיפקודית ובטוי של גליקוזילטרנספראזות בצמחים לצורך סינתזה טבעית של  
נגזרות חדשות של פלבנואידים בצמחים.**

Study and manipulation of structure/function and expression of glycosyltransferases in plants  
for natural synthesis of novel flavonoid derivatives in plants

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות ע"

יורם איל, מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני  
אהובה פרידמן, מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני  
מירה וייסברג, מדעי הצמח, מינהל המחקר החקלאי, מרכז וולקני

Yoram Eyal, Plant Sciences, ARO, Volcani Center, P.O.B. 50250 Bet-Dagan;

e-mail: [eyalab@volcani.agri.gov.il](mailto:eyalab@volcani.agri.gov.il)

Ahuva Frydman, Plant Sciences, ARO, Volcani Center, P.O.B. 50250 Bet-Dagan;

e-mail: [ahuvafr@volcani.agri.gov.il](mailto:ahuvafr@volcani.agri.gov.il)

Mira Weissberg, Plant Sciences, ARO, Volcani Center, P.O.B. 50250 Bet-Dagan;

e-mail: [miraw@volcani.agri.gov.il](mailto:miraw@volcani.agri.gov.il)

**הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.**

**הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא**

חתימת החוקר

## תקציר

מטבוליטים משניים מצמחים ממלאים תפקידים מגוונים בפיזיולוגיה של הצמח, בעלי השפעה חשובה על איכות תוצרת חקלאית (השפעות על טעם, צבע, מעכבי חימצון ועוד) ומשמשים למטרות יישומיות מגוונות ברפואה ובתעשייה. מודיפיקציות, כגון גליקוזילציות המקוטלזות על-ידי glycosyltransferases (GTs), ממלאות תפקיד מרכזי בקביעת אופיים של מטבוליטים משניים ותפקידם הביולוגי. סוג הסוכר ומיקום הגליקוזילציה מרכזיים בקביעת מאפייני המטבוליט ותיפקודו הביולוגי, ולכן יש עניין רב בלימוד מעמיק של מבנה/תיפקוד GTs. במסגרת מחקר זה אנו מתמקדים בקבוצת ה- branch-forming GTs (BFGTs) המתמחים בקטליזה של הוספת סוכר שניוני (דיסכריד) או שלישוני, שלהם השפעה מכרעת על מאפייני המטבוליט. במהלך המחקר (א) פותחו כלים ומערכות לאפיון תפקודי של BFGTs על סובסטרטים פלבנואידים שונים, תוך זיהוי ספציפיות לעמדת גליקוזילציה, בניסויים in-vivo (ב) אופיינו תיפקודית מספר BFGTs בעלי ספציפיות מגוונת לסובסטרט, תורם סוכר ועמדת גליקוזילציה. (ג) הופקו מודלים תלת-מימדיים של שני BFGTs מהדרים (1,2RhaT and 1,6RhaT); (ד) בוצע חיזוי של שינויי חומצות אמינו ב-1,6RhaT שעשויים לגרום לשינוי הספציפיות לסוכר מ-glucose ל-rhamnose באופן מושכל; (ה) הודגם שינוי בספציפיות לסוכר של 1,6RhaT מ-rhamnosyltransferase ל-glucosyltransferase באמצעות מוטגנזה מושכלת ונקודתית של הגן.

## מבוא

מטבוליטים משניים מצמחים ממלאים תפקידים מגוונים בפיזיולוגיה של הצמח, בעלי השפעה חשובה על איכות תוצרת חקלאית (השפעות על טעם, צבע, מעכבי חימצון ועוד) ומשמשים למטרות יישומיות מגוונות ברפואה ובתעשייה. מודיפיקציות, כגון גליקוזילציות המקוטלזות על-ידי גליקוזילטרנספראזות (GTs), ממלאות תפקיד מרכזי בקביעת אופיים של מטבוליטים משניים ותפקידם הביולוגי. סוג הסוכר ומיקום הגליקוזילציה מרכזיים בקביעת מאפייני המטבוליט ותיפקודו הביולוגי, ולכן יש עניין רב בלימוד מעמיק של מבנה/תיפקוד GTs. הצעה זו מתמקדת בקבוצת branch-forming GTs המתמחים בקטליזה של הוספת סוכר שניוני (דיסכריד) או שלישוני, שלהם השפעה מכרעת על מאפייני המטבוליט; לדוגמא, מרירות פירות הדר נקבעת לפי היחס שבין שני branch forming GTs, האחד מקטלז מטבוליט מר (1,2 = flavanone-neohesperidoside) והשני מקטלז תוצר חסר טעם (1,6 disaccharide = flavanone-rutinoside).

המחקר מיועד (1) לזהות ולאפיין תיפקודית גנים מועמדים חדשים ל- branch forming glycosyltransferases (BFGTs) שיעשירו את מאגר המידע לגבי רצפים המקודדים לאנזימים בעלי מיגוון מאפייני ספציפיות לסובסטרט, סוכר ועמדת גליקוזילציה. (2) לבצע לימוד מעמיק של הקשר בין מבנה BFGTs לספציפיות הפעילות שלהם (קרי: ספציפיות לעמדת הגליקוזילציה, לתורם הסוכר, וכו). (3) לפיתוח יכולות לבצע מודיפיקציות של ספציפיות של BFGTs באמצעות מוטגנזה מכוונת כדי לאפשר ייצור עתידי של חומרים ייחודיים בעלי עניין לחקלאות, רפואה או תעשיית המזון.

## פירוט עיקרי הניסויים והתוצאות

### **1. פיתוח כלים ושיטות לאפיין תיפקודי של גנים ל-BFGTs**

עבודותינו עד כה התבססו על בדיקת פעילות BFGTs (על פלבנואידים מתת-משפחות ה- flavones, flavonols, flavanones) בתאי BY2 טרנסגניים באמצעות ביוטרנספורמציה של הסובסטרט (Frydman et al., Plant J. 40: 88-100, 2004). השיטה אמנם טובה והדירה, אך קיימים בה שתי מיגבלות מרכזיות: (1) היא איננה מתאימה לאנטוציאנינים, היות שאלה אינם ניתנים ל"האכלה" במצע עקב בעיות יציבותם ב-pH נייטרלי. (2) קשה מאד לבחון בשיטה הקיימת ספציפיות לעמדת גליקוזילציה ושינויים בספציפיות לסוכר עקב ריבוי הגליקוזילציות הראשוניות החלות בתאי BY2. עקב דרישות המחקר הנוכחי, פיתחנו שיטות חדשות ופתרונות בהתאם.

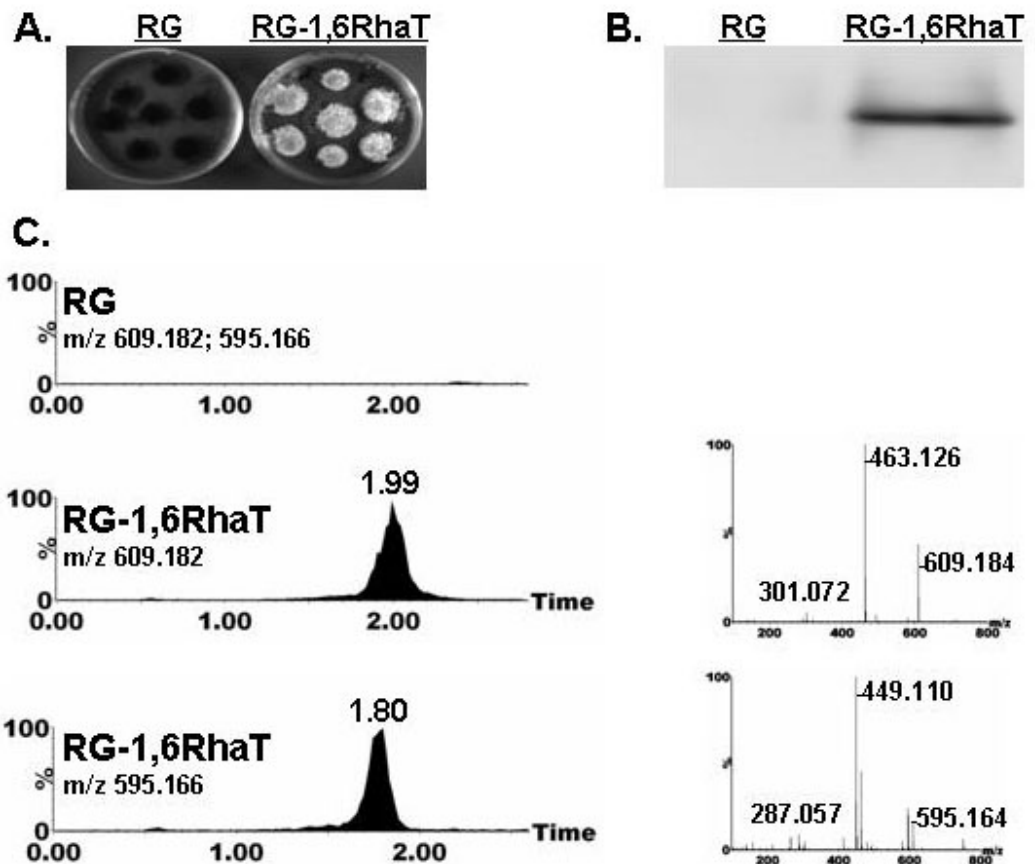
### **1.1 פיתוח יכולות לאפיין פעילות BFGTs על סובסטרטים אנטוציאנינים.**

כדי ליצור מערכת אמינה לבחינת פעילות ה-BFGTs על סובסטרטים אנטוציאנינים, בחרנו לפתח טרנספורמציה לתאי גפן אדום המייצרים וצוברים אנטוציאנינים באופן טבעי. בשלב ראשון בדקנו את הרכב האנטוציאנינים בתאי גפן אדום, כולל המודיפיקציות (ראה טבלה 1) כבסיס לבחינת השינויים שצפויים ע"י קטליזה של האנזימים הטרנסגננים. במקביל, פיתחנו יכולות טרנספורמציה לתאי הגפן האדום עם פלסמיד המיועד לביטוי במקביל של GFP והאנזים Cs1,6RhaT (BFGT) מהדרים המתמחה בהוספת הסוכר rhamnose על שייר glucose המחובר לפלבנואיד). בקווים הטרנסגננים הודגמה פעילות האנזים Cs1,6RhaT כ-BFGT הפועל על הסובסטרטים cyanidin- & peonidin-glucoside (איור 1).

**טבלה 1: אנטוציאנינים טבעיים שזוהו בתרבויות תאי גפן אדום באמצעות LC/MS.** מוצגים: מסה מדויקת ניסויית (measured mass) ומחושבת (calculated mass) וההפרש שביניהם (mDa).

Anthocyanin compound	Measured mass	Calculated mass	mDa
1. cyanidin-3-O-glucoside	449.1068	449.1084	-1.6
2. peonidin-3-O-glucoside	463.1247	463.1240	0.7
3. delphinidin-3-O-glucoside	465.1014	465.1033	-1.9
4. malvidin-3-O-glucoside	493.1332	493.1346	-1.4
5. peonidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside	505.1345	505.1346	-0.1
6. malvidin-3-O-(6-O-acetyl)-glucoside	535.1459	535.1452	0.7
7. cyanidin-3-O-(6-O-p-coumaroyl)-glucoside	595.1445	595.1452	-0.7
8. delphinidin-3-O-(6-O-p-coumaroyl)-glucoside	611.1395	611.1401	-0.6
9. peonidin-3-O-(6-O-caffeoyl)-glucoside	625.1569	625.1557	1.2
10. petunidin-3-O-(6-O-p-coumaroyl)-glucoside	625.1572	625.1557	1.5
11. malvidin-3-O-(6-O-p-coumaroyl)-glucoside	639.1718	639.1714	0.4
12. petunidin-3-O-(6-O-caffeoyl)-glucoside	641.1514	641.1506	0.8





**איור 1: פעילות BFGT טרנסגני על אנטוציאנינים בתאי גפן.** (A) פלואורסצנסיה של תאי גפן טרנסגניים ל-1,6RhaT GFP & 1,6RhaT (RG-1,6RhaT) לעומת תאי wt (RG). (B) ביטוי טרנסגני של החלבון 1,6RhaT מהדרים בתאי גפן טרנסגניים (RG-1,6RhaT) - זיהוי באמצעות נוגדן ספציפי ל-1,6RhaT. (C) פיקים ל-peonidin- rutinoside ( $m/z$  609.182) ומזוהים בלעדית בתאים טרנסגניים ל-1,6RhaT (RG-1,6RhaT) ולא בתאי wt (RG). מזוהים גם תוצרי השבירה הצפויים של כל אחד מהיונים המולקולריים.

## 1.2 פיתוח כלים לאפיון ספציפיות BFGT לעמדת גליקוזילציה ולשינויים בספציפיות לסוכר.

על-מנת לדייק בקביעת ספציפיות ה-BFGT לאתר קישור הגליקוזיד הראשוני, ובספציפיות לסוכר, בחנו שימוש בסידרת סובסטרטים פלבנואידים מלאכותיים שלהם שייר הידרוקסיל בודד המאפשר גליקוזילציה ראשונית בודדת בלבד (3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone). נבחנה פעילות שני אנזימי BFGT מהדרים (1,2RhaT, 1,6RhaT), באמצעים טרנסגניים, על הסובסטרטים המלאכותיים ונמצא שהאנזימים פעילים על הסובסטרטים בהתאם לצפוי (טבלה 2), ומתאפשרת קביעה ברורה של הספציפיות לעמדת הגליקוזילציה הראשונית. השימוש בסובסטרטים המלאכותיים מהווה כיום כלי חשוב בקביעת הספציפיות של BFGT טבעיים ושל גירסאות BFGT שעברו שינויים מושכלים המיועדים להשפיע על ספציפיות.

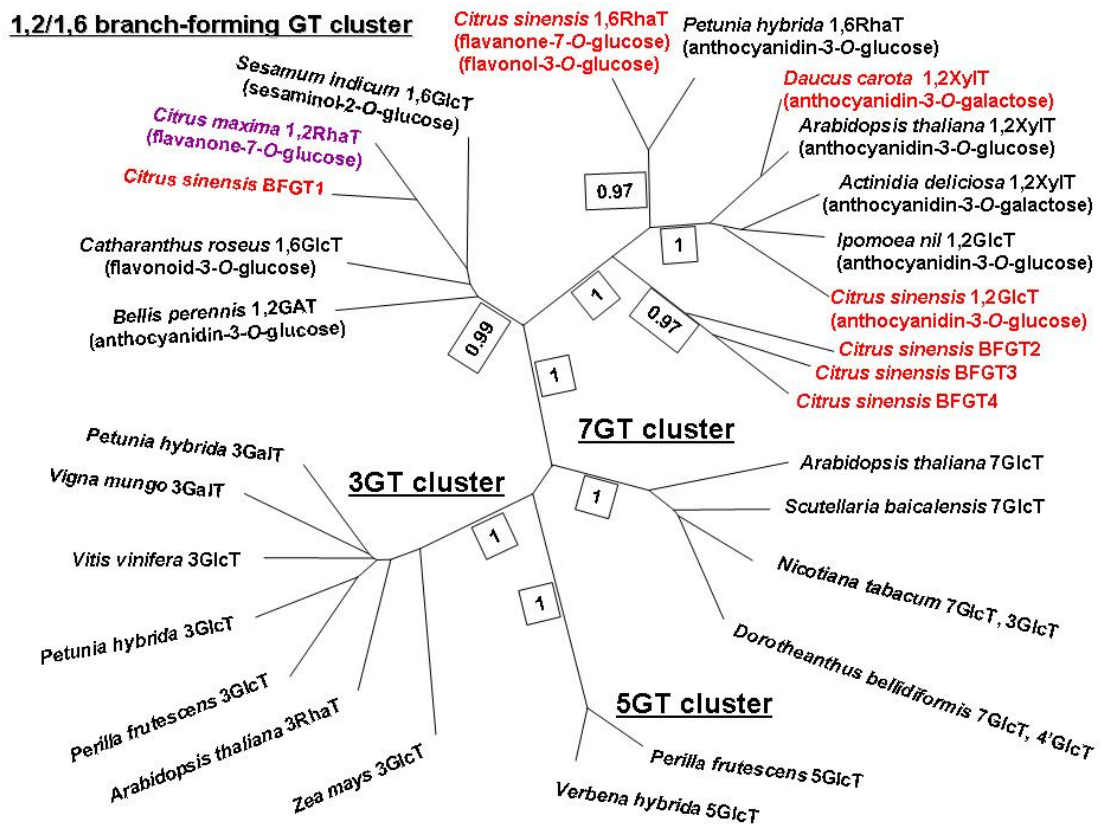
טבלה 2: פעילות BFGT על סובסטרטים מלאכותיים בעלי שייר הידרוקסיל בודד.

Recombinant enzyme:	1,2RhaT	1.6RhaT
Artificial substrate		
3-hydroxyflavone	No activity	Active
5-hydroxyflavone	No activity	No activity
7-hydroxyflavone	Active	Active

2. איתור גנים מועמדים כ-BFGT ואפיון פעילות תוצרי הגן וספציפיות

2.1 איתור גנים מועמדים בכלים ביואינפורמטיים.

כדי להרחיב את כמות הגנים המאופיינים תפקודית כ-BFGTs לצרכי הבנת מנגנון הפעולה ובניית היכולת להשפיע על ספציפיות, איתרנו גנים מועמדים באמצעים ביואינפורמטיים. החיפוש נערך במאגרי מידע גנומיים ומאגרי ESTs של הדורים וצמחים נוספים שלהם תוצרים פלבנואידים עם מודיפיקציית דו-סוכר (branched-chain sugars) (ובא לידי ביטוי בולט במפה הפילוגנטית שבה נראים כל BFGTs כתת-קבוצה נפרדת של GTs (איור 2).



**איור 2: עץ פילוגנטי של משפחת UGT-1 הכולל Primary-GTs (3GT, 5GT, 7GT clusters) ו-BFGTs (1,2/1,6 branch-forming GT cluster).** כל ה-BFGTs הידועים מהספרות מופיעים בשחור; BFGTs שנחקרו/אופיינו במחקר זה מופיעים באדום (נחקרו גנים נוספים שפעילותם לא זוהתה והם אינם מופיעים בעץ). Cm1,2RhaT (מופיע בסגול) אופיין על-ידינו במחקר קודם (Frydman et al., 2004) ושימש לניסויים גם במחקר זה.

FG404013 (*Actinidia deliciosa* 1,2XylT); AB192314 (*Ipomoea nil* 1,2GlcT); NM\_124785 (*Arabidopsis thaliana* 1,2XylT); CAA50376 (*Petunia hybrida* 1,6RhaT); AB333799 (*Sesamum indicum* 1,6GlcT); AY048882 (*Citrus maxima* 1,2RhaT); AB443870 (*Catharanthus roseus* 1,6GlcT); AB190262 (*Bellis perennis* 1,2GAT); AC006282 (*Arabidopsis thaliana* 7GlcT); BAA83484 (*Scutellaria baicalensis* 7GlcT); CAB56231 (*Dorotheanthus bellidiformis* 7GlcT, 4'GlcT); AAB36653 (*Nicotiana tabacum* 7GlcT, 3GlcT); P16166 (*Zea mays* 3GlcT); AF360160 (*Arabidopsis thaliana* 3RhaT); AAB81683 (*Vitis vinifera* 3GlcT); AAD55985 (*Petunia hybrida* 3GalT); BAA36972 (*Vigna mungo* 3GalT); BAA89008 (*Petunia hybrida* 3GlcT); BAA19659 (*Perilla frutescens* 3GlcT); BAA36423 (*Verbena hybrida* 5GlcT); BAA36421 (*Perilla frutescens* 5GlcT). *Citrus sinensis* 1,6RhaT (DQ119035); *Citrus sinensis* 1,2GlcT (1.1g017557m); *Citrus sinensis* BFGT1 (1.1g046033); *Citrus sinensis* BFGT2 (1.1g036520); *Citrus sinensis* BFGT3 (1.1g019759); *Citrus sinensis* BFGT4 (1.1g011765); *Daucus carota* 1,2XylT (Contig48470).  
 GlcT = glucosyltransferase; GalT = galactosyltransferase; RhaT = rhamnosyltransferase; XylT = xhylosyltransferase; GAT = galacturonic-acid transferase.

## 2.2 אפיון פעילות גנים מועמדים כ- BFGT.

במסגרת תכנית זו נחקרה ונחקרת פעילותם של עשרה גנים מועמדים כ-BFGTs, בעיקר מהדרים. מעבר לגן Cm 1,2RhaT (Frydman et al., Plant J. 40: 88-100, 2004), אפיון מלא כ- BFGTs הושלם לשלושה גנים:

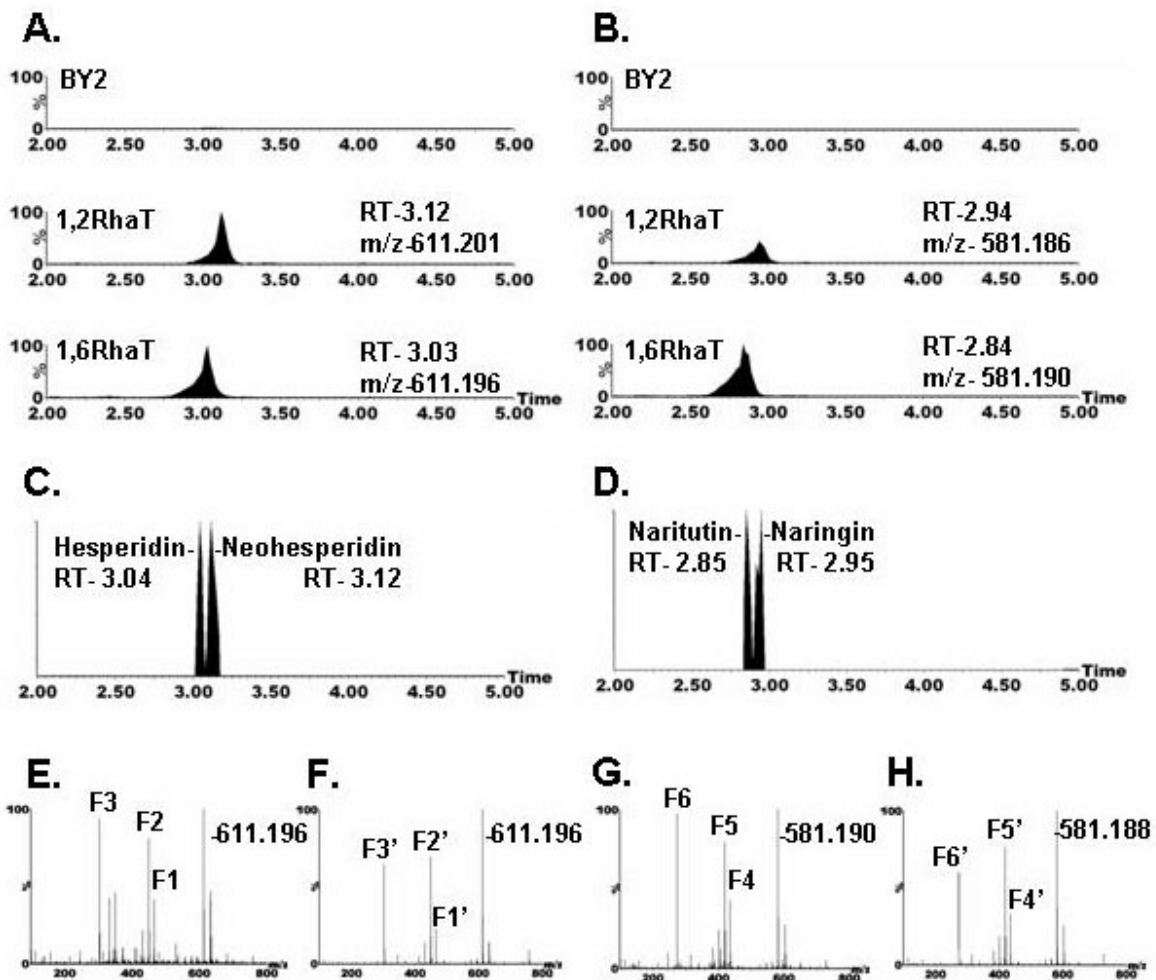
*Citrus sinensis* 1,6RhaT (Cs1,6RhaT) \*

*Citrus sinensis* 1,2GlcT (Cs1,2GlcT) \*

*Daucus carota* 1,2XylT \*

### 2.2.1 אפיון פעילות Cs1,6RhaT על סובסטרטים טבעיים

פעילות האנזים Cs1,6RhaT (בהשוואה לפעילות Cm1,2RhaT) נבחנה באמצעות תאי BY2 טרנסגניים שהואכלו בסובסטרטים פלבנואידיים טבעיים: Naringenin, Hesperetin. אפיון תוצרי הביוטרונספורמציה באמצעות accurate mass LC/MS מראה שבעוד ש-Cm1,2RhaT קיטלז ייצור של neohesperidosides מרים (neohesperidin, naringin), האנזים Cs1,6RhaT קיטלז ייצור של rutinoides חסרי טעם (Hesperedin, Narirutin). לכן נקבע כי מדובר באנזים המקטלז rhamnosylation בעמדה 6 של שייר glucose הקשור לשלד הפלבנואיד (קרי: 1,6RhaT = 1,6 rhamnosyltransferase) (איור 3).



**איור 3: אפיון פעילות של Cs1,6RhaT.** בחנו ביורנספורמציה של hesperetin (A) או naringenin (B) על-ידי תאי wild type BY2, או על ידי תאים המבטאים 1,2RhaT (Frydman et al, 2004), או על-ידי תאים המבטאים 1,6RhaT; התוצרים נבדקו באמצעות LC/MS. (C) סטנדרטים של hesperidin & neohesperidin; (D) סטנדרטים של naringin & narirutin. (E-F) יון מולקולרי ושברים של התוצרים שהתקבלו ב-A. (G-H) יון מולקולרי ושברים של התוצרים שהתקבלו ב-B.

### 2.2.2 דפוס הביטוי של Cs1,6RhaT מתאים לאנזים האחראי על ייצור הפלבנואידים חסרי הטעם

#### האופייניים למיני הדרים שאינם מרים

בחנו את הביטוי של Cs1,6RhaT במיני הדרים שונים, ונמצאה קורלציה מלאה של ביטוי האנזים עם הצטברות פלבנואידים חסרי טעם (flavanone rutinosides: narirutin, hesperidin) (איור 4). ביטוי גבוה של Cs1,6RhaT זוהה באמצעות נוגדנים בתפוזים ומנדרינות, שבהם מיוצרים רק flavanone rutinosides. לעומת זאת, לא זוהה כלל ביטוי Cs1,6RhaT בפומלו שאינו מכיל flavanone rutinosides, אלא רק

neohesperidosides flavanone- כמו-כן נמצא ביטוי נמוך של Cs1,6RhaT באשכוליות ובחושש הצوبرים בעיקר neohesperidosides ורק מעט rutinoides.

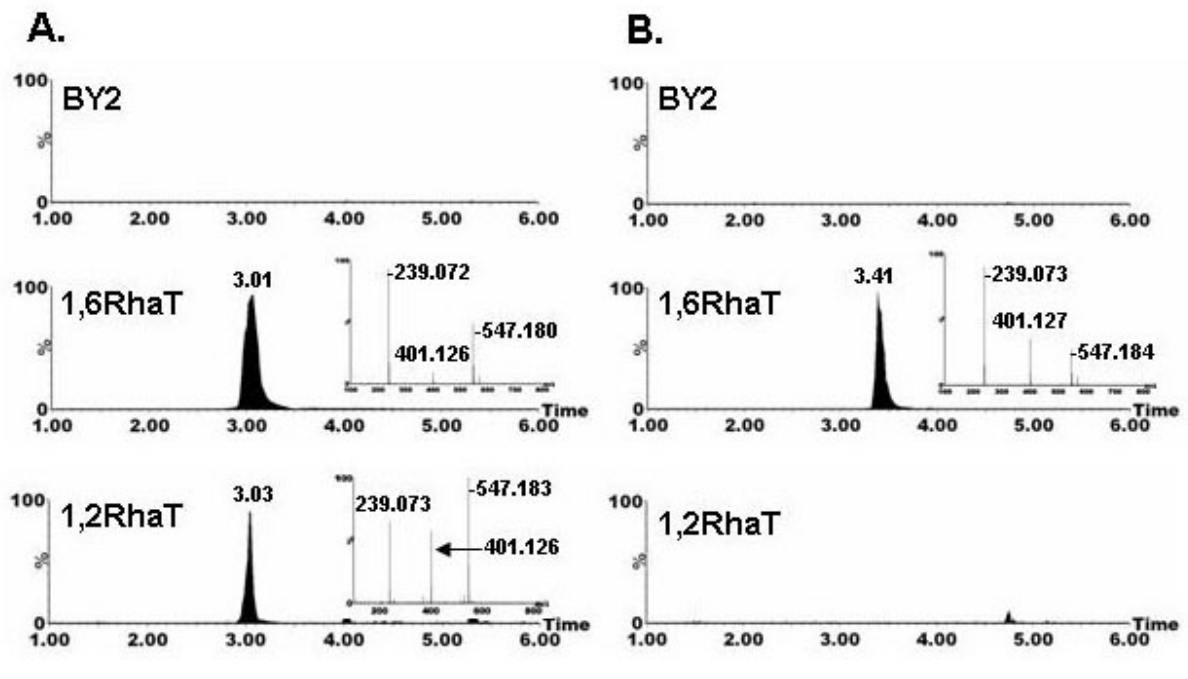
Species:	Cs	Cr	Cl	Cme	Cma	Cp	Ca
<b>Rut:</b>	+++	+++	+++	+	-	+	+
<b>Neo:</b>	-	-	-	-	+++	+++	+++

**איור 4:** ביטוי Cs1,6RhaT במיני הדריים שונים. חלבונים שהופקו מעלים צעירים של הדריים הופרדו ב-SDS PAGE והועברו במיספוג לממברנה שהוגבה עם נוגדן ספציפי נגד Cs1,6RhaT. מיני הדריים: תפוז (Cs), מנדרינה (Cr), לימון (Cl), אתרוג (Cme), פומלו (Cma), אשכולית (Cp), חושש (Ca). ריכוז ה- rutinoides (Rut) וה- neohesperidosides (Neo) מצוינים: +++ ריכוז גבוה; + ריכוז נמוך; - היעדר.

### 2.2.3 אפיון הספציפיות לעמדה של Cs1,6RhaT (סובסטרטים מלאכותיים)

ספציפיות האנזים Cs1,6RhaT לעמדת הגליקוזילציה (בהשוואה לספציפיות האנזים Cm1,2RhaT) נבחנה באמצעות תאי BY2 טרנסגניים שהאכלו בסובסטרטים פלבנואידים מלאכותיים המאפשרים גליקוזילציה ראשונית בודדת: 3-hydroxyflavone & 7-hydroxyflavone. אפיון תוצרי הביטרנספורמציה באמצעות accurate mass LC/MS מראה שבעוד ש-Cm1,2RhaT הוא ספציפי ל-glucoside-7, Cs1,6RhaT מקטלז rhamnosylation על glucose בעמדות 7 ו-3 של הפלבנואיד (איור 5).

מתוך מכלול העדויות (דפוס ביטוי, ספציפיות לסובסטרט) הסקנו ש-Cs1,6RhaT הוא אנזים המפתח בייצור ה-7-rutinosides flavanone- חסרי הטעם האופייניים למיני הדריים שאינם מרים. כמו-כן, Cs1,6RhaT הוא האנזים האחרון בביוסינתזה של flavonol-3-rutinosides המצויים בעיקר במיני הדריים שאינם מרים. למרות פעילותו של Cs1,6RhaT על אנטוציאנינים (cyanidin, peonidin), בדקנו ומצאנו שהוא אינו מעורב בביוסינתזה של אנטוציאנינים בתפוזי דם (כנראה לאור העובדה ש-Cs1,6RhaT מתבטא בעיקר ברקמות צעירות, בעוד שבתפוזי דם האנטוציאנינים מצטברים מאוחר במהלך הבשלת הפרי).



**איור 5:** אפיון ספציפיות לעמדת גליקוזילציה של **Cs1,6RhaT**. (A) ביוטרנספורמציה של 7-**hydroxyflavone** (A) או 3-**hydroxyflavone** (B) על-ידי תאי BY2 wild type (BY2), א על ידי תאים המבטאים 1,2RhaT, א על-ידי תאים המבטאים 1,6RhaT; התוצרים נבדקו באמצעות LC/MS ומוצגות כרומוטוגרמות של התוצר ו-MS הכולל את היון המולקולרי של התוצר ושברים שנגזרים ממנו.

#### 2.2.4 אפיון תיפקודי של BFGTs נוספים

באופן דומה למתואר לעיל אופיינו תוצרי הגנים:

\* *Citrus sinensis* 1,2GlcT - BFGT המקטלז הוספה של glucose לעמדה 2 של שייר glucose ב- cyanidin-3-glucose לקבלת cyanidin-sophoroside. אנזים זה מעורב בביוסינתזה של אנטוציאנינים בתפוזי דם.

\* *Daucus carota* 1,2XylT - BFGT המקטלז הוספה של xylose לעמדה 2 של שייר glucose או galactose ב- cyanidin-3-glucose או cyanidin-3-galactose לקבלת cyanidin-sambubioside או cyanidin-lathyroside. אנזים זה מעורב בביוסינתזה של אנטוציאנינים בגזר אדום.

כיום נמשכים איפיוני 4 גנים מועמדים נוספים: CsBFGT1, CsBFGT2, CsBFGT3, CsBFGT4.

### 3. לימוד הקשר בין מבנה לתיפקוד וספציפיות BFGTs באמצעות מודלים ממוחשבים של

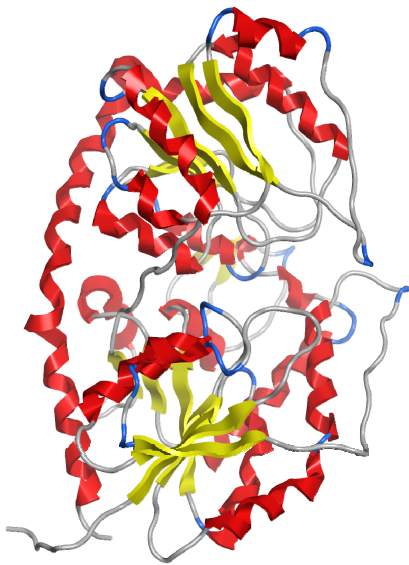
#### מבנה החלבון.

### 3.1 בניית מודלים של מבנה שני חלבוני BFGT.

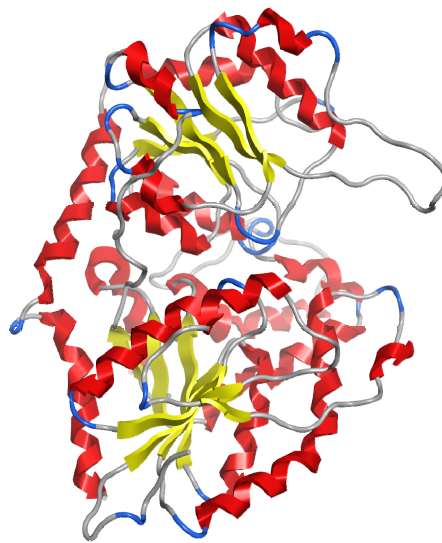
מודלים ממוחשבים שנבנו עבור האנזימים Cm1,2RhaT ו- Cs1,6RhaT (איור 6), על סמך מבנים ידועים של primary GTs, ממחישים את הדמיון המבני הרב שקיים בין אנזימים ממשפחה זו. יחד עם זאת קיימת שונות ברצף הראשוני, גם באזורים שמורים שמעורבים בקישור לסובסטרטים ובפעילות הקטליטית. בחומצות האמינו שנמצאות במגע עם הסובסטרט הפלבנואידי, ועם מרכיבי תורם הסוכר (קרי: UDP-rhamnose) נמצאו מספר הבדלים עקביים בין טרנספראזות שמעבירות glucose לעומת rhamnose (ראו איור 7):

א. ב- loop-5 בטרנספראזות של glucose יש שתי חומצות אמיניות פולריות שיוצרות קשרי מימן עם הירוקסיל C6 של ה-glucose. בטרנספראזות של rhamnose, שתי חומצות האמינו של loop-5 (153 ו-154 ב- 1,6RhaT) הן א-פולריות היות וב-rhamnose אין הידרוקסילים ב- C6.

ב. באתר קישור ה- של nucleotide-sugar הקונצוזו בטרנספראזות של glucose הוא WNS בעוד שבטראנספראזות של rhamnose קיימות החומצות האמיניות serine (S) או glycine (G) במקום asparagine (N). עדיין לא ברור לנו משמעות הבדל זה בין האנזימים.

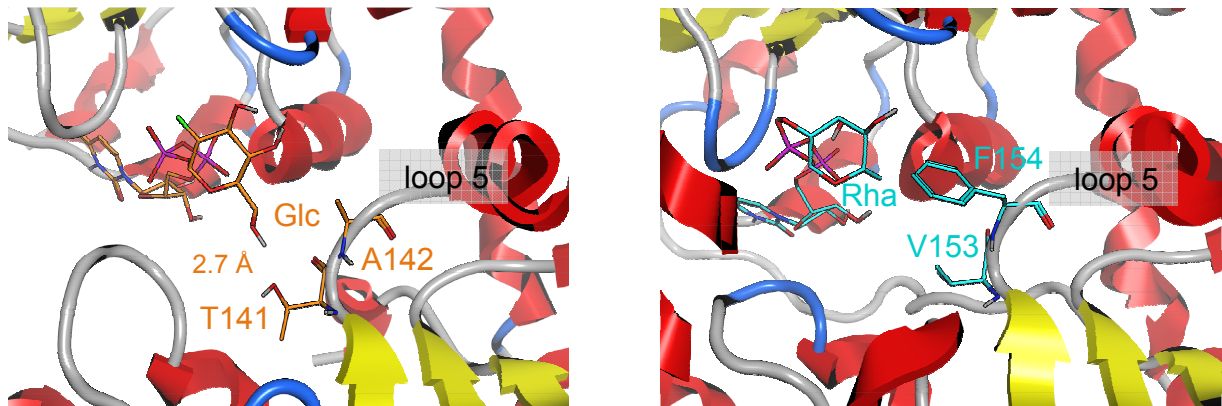


מודל למבנה Cm1,2RhaT



מודל למבנה Cs1,6RhaT

איור 6:



**איור 7: הגדלה של כיס קישור ה-nucleotide sugar.** בתמונה שמשמאל מוצגת הגדלה מתוך המבנה המפוענח ניסויית של VvGT1 (תמונה שמאלית; Offen et al., EMBO 25, 1396-1405, 2006). חומצת האמינו Thr141 הפולרית, המשתייכת ל-loop-5, נמצאת כנראה במגע עם קבוצת ההידרוקסיל (הפולרית) בפחמן-6 של glucose של תורם הסוכר (UDP-glucose). לפיכך יש סבירות גבוהה שחומצה אמינית זו (ושכנותיה) מעורבת בקביעת הספציפיות לתורם הסוכר. חומצות האמינו המקבילה ב-1,6RhaT (הגדלה בתמונה שמימין) Val153 או-Phe154 הינן הידרופוביות, ומתאימות לאינטראקציה עם קבוצת המתיל ההירופובית בפחמן-6 של rhamnose של תורם הסוכר (UDP-rhamnose).

### 3.2 חיזוי שינויים בחומצות אמיניות ב-1,6RhaT שעשויים להשפיע על ספציפיות האנזים לתורם הסוכר, וביצוע בהתאם של מוטגנזה מכוונת בגן/אנזים 1,6RhaT.

- לאור ממצאי השונות בחומצות האמינו באתר קושר ה-nucleotide sugar, הוצעו השינויים הבאים ברצף 1,6RhaT על מנת לשנות את ספציפיות האנזים מ-rhamnose ל-glucose:
- שינוי חומצות האמינו ב-loop-5 לחומצות פולריות: F154-to-S & V153-to-S.
  - שינוי אתר קישור הפוספט: S372-to-N.
  - שילוב שלושת השינויים: F154-to-S & V153-to-S & S372-to-N.

גירסאות השינויים השונות בוצעו באמצעות מוטגנזה מכוונת בגן המקודד ל-1,6RhaT. הגירסאות המוטנטיות שובטו לוקטור בינארי ועברו טרנספורמציה לתרבית תאי טבק (BY2) באמצעות אגרובקטריום, ופעילות האנזים המקודד נבחנה על הסובסטרטים 3-hydroxyflavone & 7-hydroxyflavone. באופן בולט, שילוב המוטציות (V153-to-S, F154-to-S, S372-to-N) גרם להחלפת פעילות ה-rhamnosyltransferase לפעילות glucosyltransferase (טבלה 3). יצויין שקשה לכמת את רמת הפעילות, היות ומדובר בפעילות in-vivo,



ומתרחשות מודיפיקציות נוספות בתא. יחד-עם-זאת ניתן לומר באופן ברור שהמוטציות גרמו לשינוי בספציפיות לסוכר.

טבלה 3: סיכום תוצאות פעילות של גירסאות מוטנטיות של 1,6RhaT (שינוי הספציפיות לסוכר).

<u>1,6RhaT version</u>	<u>Primary glucosyl position</u>	<u>Rhamnosyltransferase (RhaT) activity</u>	<u>Glucosyltransferase (GluT) activity</u>
Wild-type	7	Yes	No
F154-S	7	Very low	Very low
S372-N	7	Yes (reduced)	No
V153-S; F154-S; S372-N	7	No	Yes
Wild-type	3	Yes	No
F154-S	3	No	No
S372-N	3	Yes (reduced)	No
V153-S; F154-S; S372-N	3	No	Yes
Wild-type	5	No	No

## דיון

### 1. פיתוח כלים לבחינת פעילות BFGT על אנטוציאנינים.

גפן אדום בוסס כמערכת לאפיון BFGT לאור אפיון הרכב האנטוציאנינים והיעדר ברור של anthocyanidin-disaccharides. פותחו שיטות יעילות לטרנספורמציה של BFGT לגפן אדום ואפיון של הרכב האנטוציאנינים. הודגם בבירור פעילות BFGT טרנסגני באמצעות זיהוי תוצרים anthocyanidin-disaccharides.

### 2. פיתוח מערכת לזיהוי שינויים בספציפיות לסוכר ועמדה של BFGTs (in-vivo).

פותחה היכולת לזהות שינויים בספציפיות אנזימי GT (in-vivo) ע"י שימוש במערכת סובסטרטים מלאכותיים המקטינה מאד את "רעשי הרקע" של הגליקוזילציות המתרחשות בתא החי. מערכת סובסטרטים זו משרתת אותנו בכל מהלך המחקר בזיהוי שינויי ספציפיות של אנזימי BFGT "מהונדסים".

### 3. הרחבת מאגר המידע של BFGT מאופיינים תיפקודית.

כ-10 גנים מועמדים כמקדדים ל-BFGT נבדקו (או בשלבי בדיקה) במערכת האפיון in-vivo שפיתחנו. שלושה אנזימים אופייניו באופן מלא ומרחיבים את תמונת סוגי ה-BFGT המוכרים ברמת רצף ופעילות. מאגר זה משמש אותנו במסגרת הבנת הקשר בין מבנה לתיפקוד וספציפיות BFGTs.

#### 4. בניית מודל למבנה 1,6RhaT ו-1,2RhaT על סמך הומולוגיה מוגבלת.

נבנו מודלים לשני BFGT על בסיס הומולוגיה מוגבלת (כ-25%) לאנזימי primary-GT שהמבנה שלהם פוענח ניסויית. מודלים אלה איפשרו זיהוי של חומצות האמינו המעורבות בספציפיות לתורם הסוכר והיוו בסיס לשינויים מושכלים לצורך שינוי הספציפיות.

#### 5. שינוי מושכל בספציפיות של branch-forming GT לוסוכר.

הדגמנו שניתן לבצע שינויים נקודתיים מושכלים לצורך שינוי ספציפיות אנזימי BFGT מפעילות rhamnosyltransferase לפעילות glucosyltransferase. בכך הודגם הפוטנציאל לשימוש בתובנות ממודלים של מבנה האנזימים לצורך enzyme engineering. הפוטנציאל לטווח ארוך כולל ייצור מטבוליטים משניים בעלי תכונות פיזיקו-כימיות ייחודיות שאינם מוכרים כיום ממקורות טבעיים.

#### פרסומים ממחקר זה

**Frydman A., Liberman R., Huhman DV., Carmeli-Weissberg M., Sapir-Mir M., Ophir R., Sumner LW. and Eyal Y.** (2012) The molecular and enzymatic basis of bitter/non-bitter flavor of citrus fruit; Evolution of branch-forming rhamnosyltransferases under domestication. In press: *The Plant Journal*. DOI: 10.1111/tpj.12030.

**Liberman R., Pienkny S., Frydman A. Schulze E., Brandt W. and Eyal Y.** Sugar-donor-specificity in rhamnosyltransferases – Targeted mutations lead to change in activity. In preparation.

**סיכום עם שאלות מנחות (דו"ח מסכם 09-0760-203)**

<b>מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית</b>
1. פיתוח כלים לאפיון BFGTs והרחבת מאגר המידע של BFGTs מאופיינים תיפקודית.
2. ביצוע structural modeling של BFGTs על-סמך primary-GTs מאופיינים.
3. חיזוי וביצוע שינויים ברצף חומצות אמיניות של BFGT שעשויים להשפיע על ספציפיות האנזים (לדוגמא : לתורם הסוכר) (rational design).
4. אפיון גירסאות BFGT ש"הונדסו" על סמך rational design ובחינת השינוי בספציפיות האנזים
<b>עיקרי הניסויים והתוצאות.</b>
1. הופקו מודלים תלת-מימדיים של ה-12RhaT and 1,6RhaT : branch-forming GTs.
2. בוצעו חיזויים לשינוי ספציפיות האנזים 1,6RhaT מהסוכר glucose-ל rhamnose.
3. בוצע מערך מוטציות נקודתיות ברצפים של 1,6RhaT, על סמך המודל, לצורך שינוי הספציפיות לסוכר.
4. בוצעו בדיקות פעילות לגירסאות 1,6RhaT מוטנטיים in-vivo. בגירסא המשלבת מספר מוטציות התקבל שינוי הספציפיות לסוכר מ-glucose-ל rhamnose.
<b>מסקנות מדעיות והשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.</b> האם הושגו מטרות המחקר?
1. הושגו מטרות המחקר באופן מלא.
2. פותחו כלים שיאפשרו אפיון פעילות וספציפיות כל BFGT על סובסטרטים פלבנואידים שונים, כולל אנטוציאנינים.
3. הצלחת חיזוי מוטציות לשינוי ספציפיות הסוכר על בסיס המודל מהווה ולידציה לדיוק מודל מבנה האנזים.
3. לאור ההצלחה שינוי ספציפיות האנזים 1,6RhaT לסוכר, הודגם הפוטנציאל לבצע שינויים נוספים בספציפיות BFGTs (קרי : ספציפיות לעמדה וסובסטרט)
<b>בעיות שנתרו לפתרון</b> ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה ; התייחסות המשך המחקר לגביהן, האם יושגו מטרות המחקר בתקופה שנתרה לביצוע תוכנית המחקר?
כל הבעיות הטכניות במערכת המחקר נפתרו והמערכת מניבה תוצאות ברורות (קרי : מחקר עתידי יתמקד בחיזויים נוספים לשינוי ספציפיות האנזימים (לסוכר, עמדה, סובסטרט).
<b>הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח</b>
<b>מאמר ראשון התקבל :</b> Frydman A., Liberman R., Huhman DV., Carmeli-Weissberg M., Sapir-Mir M., Ophir R., Sumner LW. and Eyal Y. (2012) The molecular and enzymatic basis of bitter/non-bitter flavor of citrus fruit; Evolution of branch-forming rhamnosyltransferases under domestication. In-press: <i>The Plant Journal</i> . DOI: 10.1111/tpj.12030
* מאמר נוסף מצוי בשלבי כתיבה.
<b>פרסום הדוח :</b> ללא הגבלה
<b>האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי?</b>